

Aus dem Institut für
Veterinär-Physiologie, - Biochemie, -Pharmakologie und
-Toxikologie
- Fachrichtung Biochemie -
im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

DIE ZUSAMMENSETZUNG DER NEUTRALFETTE UND PHOSPHOLIPIDE DER PFERDETHROMBOZYTEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Muhs
Tierarzt aus Illerrieden

Berlin 1975
Journal - Nr. 861

Aus dem Institut für
Veterinär-Physiologie, - Biochemie, -Pharmakologie und
-Toxikologie
- Fachrichtung Biochemie -
im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

DIE ZUSAMMENSETZUNG DER NEUTRALFETTE UND PHOSPHOLIPIDE DER PFERDETHROMBOZYTEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Muhs
Tierarzt aus Illerrieden

Berlin 1975
Journal - Nr. 861

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Veterinärmedizin der Freien Universität
Berlin

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Loppnow

Referent: Prof. Dr. H. Weik

Korreferent: Prof. Dr. M. Opitz

Tag der Promotion: 24. Juni 1975

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	Seite 2
B. MATERIAL UND METHODIK	3
1. Gewinnung der Thrombozyten	3
1.1 Eiweißbestimmung in der Thrombozytensuspension	4
2. Extraktion und Reinigung der Lipide	4
2.1 Bestimmung des Gesamtcholesterins und des freien Cholesterins im Gesamtlipidextrakt	4
3. Dünnschichtchromatographie	5
3.1 Abtrennung der Phospholipide von den Neutralfetten und Fraktionierung der Neutralfette	6
3.2 Bestimmung des Glycerins und der freien Fettsäuren	7
3.3 Bestimmung des Lipidphosphors	7
3.4 Fraktionierung der Phospholipide	7
4. Darstellung der Fettsäurenmethylester	8
5. Gaschromatographische Untersuchung der Fettsäurenmethylester	8
C. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	12
D. ZUSAMMENFASSUNG	33
E. LITERATURVERZEICHNIS	35



A. EINLEITUNG

Die Blutplättchen oder Thrombozyten spielen eine große Rolle bei der Blutgerinnung. Als Träger gerinnungsaktiver Stoffe sind sie maßgeblich an der Bildung des Thrombins beteiligt.

Die Phospholipide der Blutplättchen verdienen besondere Beachtung, da Prothrombin zum Zwecke der Aktivierung an den Phospholipidanteil der Blutplättchen gebunden wird. Die Geschwindigkeit der Aktivierung des Prothrombins ist in vitro vom Phospholipidgehalt des Reaktionsgemisches abhängig (BARTON, 1967; HENKER und KAHN, 1967; LÜSCHER, 1969; GITEL et al., 1973).

Erste chemische Untersuchungen der Blutplättchen gehen auf HAUROWITZ und SLADEK (1928) zurück; doch erst der Einsatz von Papier- und Dünnschichtchromatographie ermöglichten eine Differenzierung der Plättchenphospholipide (O'BRIEN, 1958; WESTHAL et al., 1960; MARCUS et al., 1960; BLOMSTRAND et al., 1962; NECHT und SLOTTA, 1962).

Mit Einführung der Gaschromatographie in die Lipidanalytik erhielt man genauere Kenntnisse über die Fettsäurezusammensetzung der Lipide. Besonderes Augenmerk richtete man auf die ungesättigten Fettsäuren, deren Gegenwart für die thromboplastische Aktivität notwendig sein soll (FISCHER und DEUTSCH, 1969; COHEN und DERKSEN, 1969).

Zum besseren Verständnis der Bedeutung der Lipide für die Blutgerinnung ist es notwendig, die Kenntnisse über deren chemischen Aufbau zu vervollständigen. Die bisher durchgeführten Untersuchungen befassen sich mit dem Aufbau der Plättchenlipide des Menschen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zusammensetzung der Neutralfette und der Phospholipide der Pferdethrombozyten zu untersuchen.

B. MATERIAL UND METHODIK

1. Gewinnung der Thrombozyten

Für die Untersuchungen standen 4 klinisch gesunde Pferde im Alter von 9 - 13 Jahren zur Verfügung: Ein Fjordpferd (Pferd 1) und drei Traber (Pferd 2, 3, 4).

In Vorversuchen, denen die Arbeiten von MINOR und BURNETT (1952), DOCZY (1965), MOURAD (1968), STEIN und KARL (1969), HECKERS und STOFFEL (1972), BREDDIN (1968), MARCUS und SPAET (1958) und SCOTT et al. (1961) zugrunde gelegt wurden, wurde eine Methode ausgearbeitet, mit deren Hilfe eine möglichst große Anzahl reiner Thrombozyten gewonnen werden konnte: Die Vena Jugularis wurde mit einer Braunüle punktiert und 8 l Blut mit 100 ml Plastikspritzen entnommen, in die vorher 15 ml einer 3,8%igen Tri-Na-Citratlösung aufgezogen worden waren. So war eine sofortige Durchmischung des Blutes mit dem Antikoagulans gewährleistet. Das Citratblut wurde bei 4°C in 2 l-Plastikbechern zum Sedimentieren aufgestellt. Nach ca. 1,5 - 2 Stunden wurde das überstehende plättchenreiche Plasma, das dann ungefähr 60% des Gesamtvolumens ausmachte, mit silikonisierten Pipetten abgehebert. (Zum Silikonisieren wurden die Pipetten mit einer 2-3%igen Silikonöl-Tetrachlorkohlenstofflösung benetzt und 4 Stunden bei 165°C erhitzt.) Von dem plättchenreichen Überstand wurden noch vorhandene Erythrozyten bei 4°C mit 700 x g in 20 Minuten abentrifugiert. Der Überstand wurde erneut 30 Minuten bei 4°C mit 2500 x g zentrifugiert. Das gewonnene Sediment bestand aus Thrombozyten, die in einer Zählkammer nach THOMA mit einem Phasenkontrastmikroskop auf ihre Reinheit überprüft wurden: 10⁵ Blutplättchen waren mit 2-3 Erythrozyten kontaminiert.

Die Thrombozyten wurden in 50 ml physiologischer Kochsalzlösung, der 0,5 ml einer 10%igen EDTA-Lösung zugesetzt waren,

suspendiert und erneut abzentrifugiert (30 Minuten, 4°C , $2500 \times g$). Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Nach den Waschen wurden die aus 8 l Pferdeblut gewonnenen Thrombozyten in 25 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

1.1 Eiweißbestimmung in der Thrombozytensuspension.

Um eine Bezugsgröße für die Quantifizierung der Lipide zu erhalten, wurde der Eiweißgehalt der Thrombozytensuspension bestimmt. 1 ml der Suspension wurde für die Eiweißbestimmung nach LOWRY et al. (1951) eingesetzt. Diese Farbreaktion beruht auf: 1. Der Biuret-Reaktion, 2. Der Reduktion der Phosphormolybdänsäure und der Phosphorwolframsäure durch die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Es entsteht eine blaue Farbe, deren Intensität der Eiweißkonzentration proportional ist. Die Extinktion wurde im Eppendorf-Photometer bei 578 nm gemessen.

2. Extraktion und Reinigung der Lipide.

Die Lipide wurden aus der Thrombozytensuspension dreimal mit jeweils der zehnfachen Menge Chloroform-Methanol (1:1, V/V) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 1/10 ihres Volumens einer 0,1 M KCl-Lösung gewaschen (WAYS und HANAHAN, 1964).

2.1 Bestimmung des Gesamtcholesterins und des freien Cholesterins im Gesamtlipidextrakt.

Da für eine Cholesterinbestimmung eine Fraktionierung der Lipide nicht erforderlich ist, wurde in einem aliquoten Teil des gereinigten Gesamtlipidextrakts das Gesamtcholesterin und in einem andern aliquoten Teil - nachdem es mit Digitonin

gefüllt worden war (ZAK et al., 1954; LEFFLER, 1959) - das freie Cholesterin bestimmt. Die Bestimmung des gesamten, wie die des freien Cholesterins erfolgte nach WATSON (1960): Cholesterin bildet mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure einen blaugrünen Farbstoff, dessen Intensität der Cholesterinkonzentration proportional ist. Die Extinktion wurde im Eppendorf-Photometer bei 578 nm gemessen. Der Gehalt an verestertem Cholesterin ist gleich der Differenz aus Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin.

3. Dünnschichtchromatographie.

Für die Dünnschichtchromatographie wurde Kieselgel HR (Merck) mit einem Camag-Beschichtungsautomaten 21602 auf Glasplatten 20 x 20 cm in einer Schichtdicke von 0,5 mm aufgetragen. Die beschichteten Platten wurden 3 1/2 Stunden in dem Fließmittel Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (50:28:10:2, V/V/V/V) gereinigt. Anschließend wurde die Kieselgelfront in einer Breite von 1 cm abgekratzt und verworfen. Zur Weiterverwendung wurden die Platten um 90° gedreht. Nach der Reinigung wurden die Platten 1 Stunde bei 110°C aktiviert und bis zum Gebrauch in einem Exsikkator aufbewahrt.

Damit die zum Teil sehr schwierigen Trennungen der Lipide reproduziert werden konnten, wurden die Bedingungen, unter denen die Dünnschichtchromatographie durchgeführt wurde, konstant gehalten: Temperatur: 21°C, relative Luftfeuchtigkeit: 75%.

Die mit Filterpapier ausgekleideten Chromatographiekammern wurden mindestens 2 Stunden mit dem Fließmittel zur Sättigung der Gasphase stehen gelassen. Jede Dünnschichtchromatographieplatte wurde einzeln in einer Kammer entwickelt.

Die entwickelten Platten wurden mit 2'-7'-Dichlorfluorescein (methanolische Lösung, gereinigt nach PARKER und PETERSON, 1965) angesprüht und die einzelnen Lipidflecken im UV-Licht

(350 nm) sichtbar gemacht. Die Identifizierung der verschiedenen Fraktionen erfolgte mit Hilfe von Referenzsubstanzen¹⁾.

3.1 Abtrennung der Phospholipide von den Neutralfetten und Fraktionierung der Neutralfette.

Der Gesamtlipidextrakt wurde auf ungefähr 1 ml eingeeengt und mit Eppendorf-Mikropipetten auf die Kieselgelplatten aufgetragen. Die Platten wurden 40 Minuten in Petroläther/Diäthyläther/Eisessig (30:70:1, V/V/V) entwickelt. Dieser erste Arbeitsgang diente der Auftrennung der Neutralfette in Monoglyceride, freies Cholesterin, Diglyceride und freie Fettsäuren. Triglyceride und Cholesterinester wurden in diesem Arbeitsgang nicht getrennt. Die Phospholipide blieben auf dem Startpunkt zurück.

Um die Cholesterinester von den Triglyceriden abzutrennen und um einen möglichst hohen Reinheitsgrad aller Fraktionen zu erzielen, wurden die Neutralfette mit folgenden Fließmitteln in der angegebenen Zeit rechromatographiert:

	Fließmittel Petrol-/Diäthyläther/Eisessig (V/V/V)	Zeit (min)
Triglyceride und Cholesterinester	90:10:1	50
Freie Fettsäuren	80:20:1	50
Diglyceride	50:50:1	45
Monoglyceride	30:70:1	75

¹⁾ Bezogen von: Fa. Applied Science, Laboratories, State College, Pa., USA und Fa. Supelco, Inc. Bellefonte, Pa., USA.

3.2 Bestimmung des Glycerins und der freien Fettsäuren.

Die Neutralfette wurden aus dem Kieselgel mit Chloroform/Methanol (2:1, V/V) extrahiert. Zur quantitativen Bestimmung wurde ein aliquoter Teil der Mono-, Di- und Triglyceride nach Abdampfen des Lösungsmittels in 0,2 ml Äthanol aufgenommen und mit 0,5 ml äthanolischer KOH bei 70°C in 30 Minuten verseift. Das freigesetzte Glycerin wurde enzymatisch nach EGGSTEIN (1966) und EGGSTEIN und KREUTZ (1966) bestimmt. Von der Fraktion der freien Fettsäuren wurde ein aliquoter Teil zur titrimetrischen Bestimmung nach KO und ROYER (1967) abgenommen.

3.3 Bestimmung des Lipidphosphors.

In einem aliquoten Teil der Phospholipidfraktion wurde der Phosphatgehalt nach PARKER und PETERSON (1965) bestimmt. Diese nach BARTLETT (1959) modifizierte Methode erlaubt es, die Phosphorbestimmung direkt im Kieselgel durchzuführen: Organisch gebundener Phosphor wird in Ammoniumphosphomolybdat übergeführt und mit einem Reduktionsmittel versetzt. Es entsteht ein blauer Farbstoff, dessen Intensität dem Phosphorgehalt proportional ist. Die Extinktion wurde in einem Zeiss-Photometer M4 QIII bei einer Wellenlänge von 820 nm gemessen.

3.4 Fraktionierung der Phospholipide.

Für die Fraktionierung wurde der Rest der Phospholipide aus dem Kieselgel mit Chloroform/Methanol (2:1, V/V) extrahiert. Der Extrakt wurde auf ungefähr 1 ml eingeeengt und mit Mikropipetten auf die Kieselgelplatten aufgetragen. Als Fließmittel diente Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (50:28:10:1, V/V/V/V). Die Entwicklungszeit betrug 2 1/4 Stunden (modifiziert nach SKIPSKI et al., 1967).

Bei diesem Arbeitsgang wurden Sphingomyelin, Lecithin, Lysocolaminkephalin, Inositphosphatid, eine nicht identifizierte Fraktion und Cardiolipin voneinander getrennt, während Serinkephalin und Colaminkephalin noch eine gemeinsame Fraktion bildeten. Die Abtrennung des Serinkephalins vom Colaminkephalin wurde mit Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (50:28:10:2, V/V/V/V) erzielt.

In einem aliquoten Teil jeder Phospholipidfraktion wurde der Phosphatgehalt in derselben Weise bestimmt, wie es bereits für die Gesamtphospholipidfraktion beschrieben wurde.

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Phospholipide mit Chloroform/Methanol (2:1, V/V) aus dem Kieselgel extrahiert.

4. Darstellung der Fettsäurenmethylester.

Die freien Fettsäuren wurden mit 5%iger methanolischer Schwefelsäure verestert. Alle übrigen Lipidfraktionen, mit Ausnahme des Sphingomyelins, wurden ebenfalls mit methanolischer Schwefelsäure, ohne vorherige Verseifung, direkt umgeestert (ZÖLLNER und EBERHAGEN, 1965). Die Fettsäuren des Sphingomyelins, die säureamidartig an das Sphingosin gebunden sind, wurden mit 2n methanolischer Salzsäure in ihre Methylester übergeführt (KATES, 1964). Die Veresterungsmethoden waren an Hand einer Testmischung überprüft worden und hatten zu einer guten Übereinstimmung geführt.

5. Gaschromatographische Untersuchung der Fettsäurenmethylester.

Für die gaschromatographische Untersuchung der Fettsäurenmethylester wurde das Modell 1200 der Fa. Varian aerograph mit Flammenionisationsdetektor verwendet. Die Säulenlänge betrug 3 m, der Säulendurchmesser 1/8 Zoll. Als stationäre

Phase diente 10% EGSS-X auf Gas-Chrom P, 100-120 Mesh¹⁾.
Am Gaschromatographen wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Temperaturen:

Träger-Gas:	N ₂ , 10 ml/min	Säule:	180°C
Wasserstoff:	22 ml/min	Injektor:	250°C
Luft:	250 ml/min	Detektor:	280°C

Die Fettsäurenmethylester wurden durch Cochromatographie mit reinen bekannten Fettsäurenmethylestern²⁾ identifiziert.
Folgende Fettsäurenmethylester standen zur Verfügung:

12:0	Dodecansäuremethylester
14:0	Tetradecansäuremethylester
16:0	Hexadecansäuremethylester
16:1	Hexadecensäuremethylester
17:0	Heptadecansäuremethylester
18:0	Octadecansäuremethylester
18:1	Octadecensäuremethylester
18:2	Octadecadiensäuremethylester
18:3	Octadecatriensäuremethylester
20:0	Eicosansäuremethylester
20:1	Eicosensäuremethylester
20:4	Eicosatetraensäuremethylester
22:0	Docosansäuremethylester
23:0	Tricosansäuremethylester
24:0	Tetracosansäuremethylester
24:1	Tetracosensäuremethylester

1) Bezogen von: Fa. Applied Science Laboratories,
State College, Pa., USA

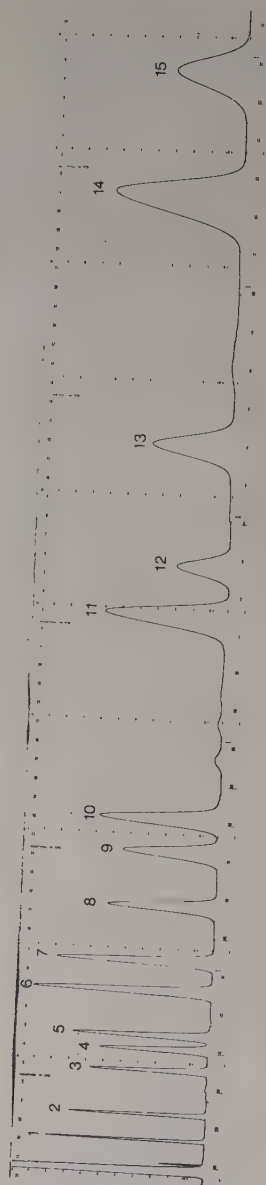
2) Bezogen von: Fa. E. Merck, Darmstadt und
Fa. Applied Science Lab.

Diejenigen Peaks, die keiner der Referenzsubstanzen zugeordnet werden konnten, wurden nach der "Carbon-Number"-Methode identifiziert (WOODFORT und VAN GENT, 1959). Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Messung der Peakhöhe multipliziert mit der Peakbreite in der halben Höhe (BALL und HARRIS, 1968). Der prozentuale Flächeninhalt wurde mit Hilfe eines Korrekturfaktors, der an Hand der Testlösung ermittelt worden war, in Gewichtsprozente umgerechnet (KAISER, 1964).

Die Fettsäurenmethylester, deren Anteil an der Gesamtmenge kleiner als 1% war, wurden in den Ergebnissen nicht berücksichtigt. In Abbildung 1 ist das Chromatogramm der verwendeten Testmischung zu sehen.

ABBILDUNG 1

Fettsäurenmethylester der Testmischung



1. 12:0 Dodecansäure
2. 14:0 Tetradecansäure
3. 16:0 Hexadecansäure
4. 16:1 Hexadecensäure
5. 17:0 Heptadecansäure
6. 18:0 Octadecansäure
7. 18:1 Octadecensäure
8. 18:2 Octadecadiensäure
9. 20:0 Eicosansäure
10. 18:3 Octadecatriensäure und 20:1 Eicosensäure
11. 22:0 Docosansäure
12. 20:4 Eicosatetraensäure
13. 23:0 Tricosansäure
14. 24:0 Tetracosansäure
15. 24:1 Tetracosensäure

C. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Ausbeute an Thrombozyteneiweiß bezogen auf 1 l Pferdeblut und über das Lipid-Proteinverhältnis in den Thrombozyten. Es fällt auf, daß bei Pferd 1 etwa doppelt so viel Thrombozyteneiweiß gewonnen wurde (114,4 mg) wie bei den übrigen Pferden (54,7-69,8 mg pro l Blut). Das Fett-Eiweißverhältnis ist mit etwa 14 mg Fett pro 100 mg Thrombozyteneiweiß bei allen Tieren nahezu gleich. Die Phospholipide stellen etwa 70% der Gesamtfette.

TABELLE 1

Lipid-Protein Verhältnis in den Thrombozyten

	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
Protein mg/l Blut	114,4	69,8	59,2	54,7
Gesamtlipide ^{x)}	13,2	15,7	12,7	15,7
Neutralfette ^{x)}	3,8	4,0	3,9	4,0
Phospholipide ^{x)}	9,4	11,7	8,8	11,7

x) mg/100 mg Protein

Abbildung 2 zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Neutralfette, die im ersten Arbeitgang erreicht wurde und bei der die Triglyceride und Cholesterinester noch als einheitliche Fraktion erscheinen.

Im ersten Arbeitgang der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Phospholipide wurden Serinkephalin und Colaminkephalin nicht getrennt, wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist. Die nicht identifizierte Fraktion wandert zwischen Serin- und Colaminkephalin einerseits und der Cardiolipinfraktion andererseits und ist auf der Abbildung nicht zu erkennen.

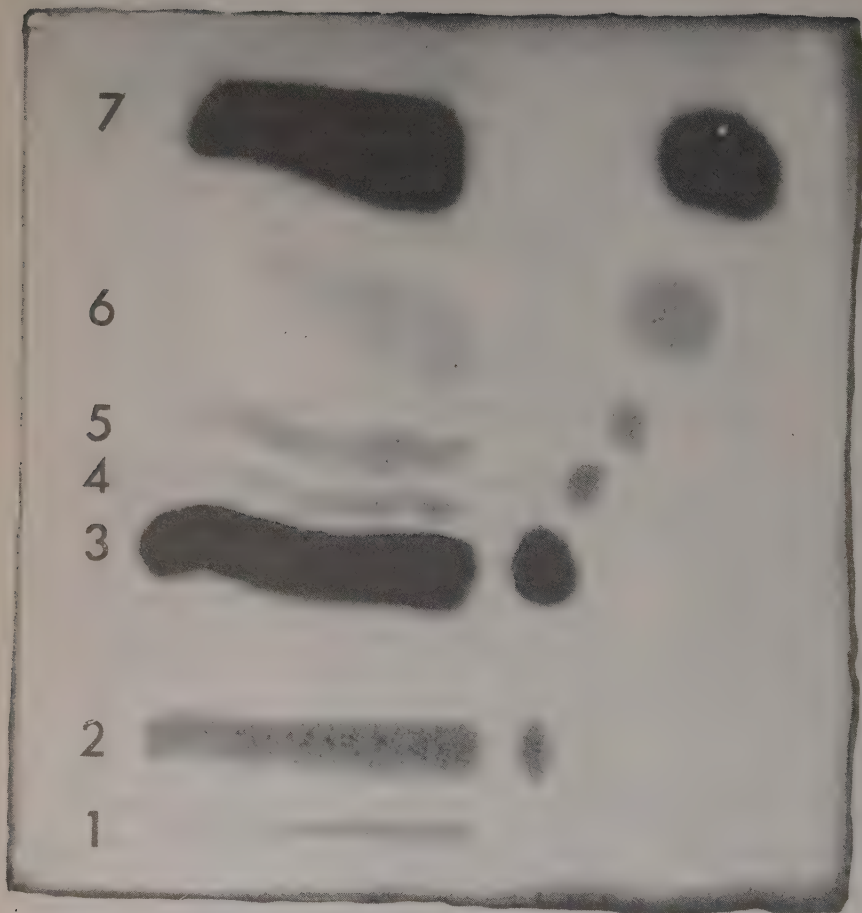


ABBILDUNG 2: Dünnschichtchromatographische Auftrennung
der Neutralfette

Fließmittel: Petroläther/Diäthyläther/Eisessig (30:70:1, V/V/V), Entwicklungszeit: 40 Minuten. 1 = Startpunkt mit Phospholipiden, 2 = Monoglyceride, 3 = freies Cholesterin, 4 = 1.2-Diglyceride, 5 = 1.3-Diglyceride, 6 = freie Fettsäuren, 7 = Triglyceride und Cholesterinester. Sprühreagenz: 5%ige Chromschwefelsäure. Kamera: Plaubel Peco Junior 9x12/10x15 mit Symmar-Objektiv 1:5,6. Film: Polaroid 4x5 Landplanfilm, Typ 55. Blende 19, Belichtungszeit: 1 Sekunde.

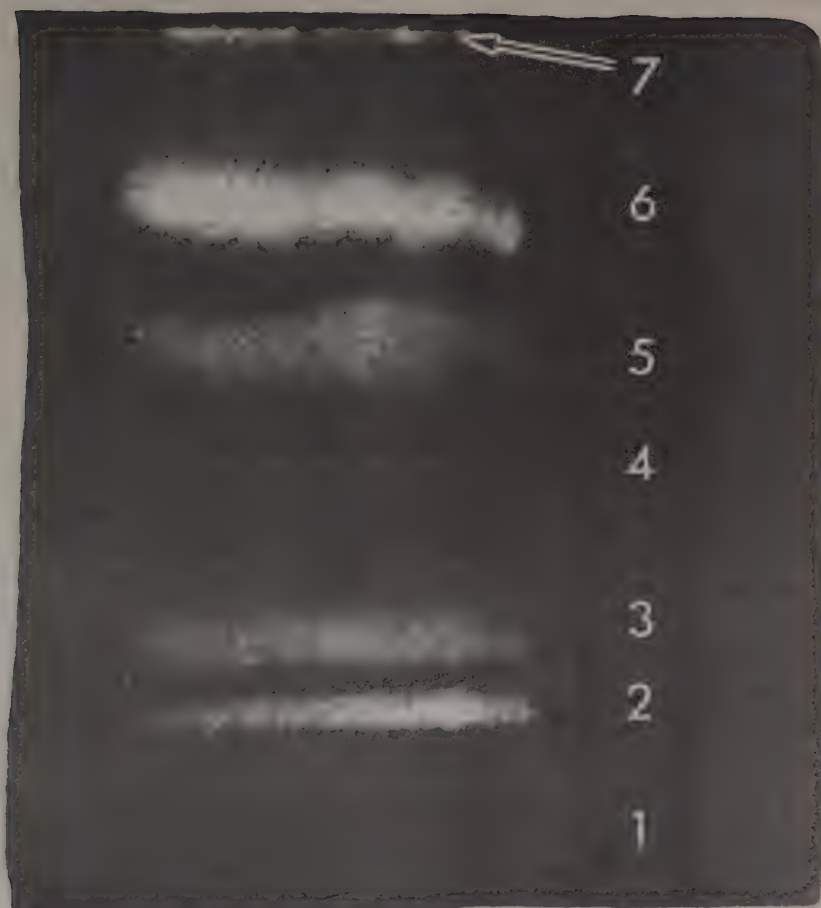


ABBILDUNG 3: Dünnschichtchromatographische Auftrennung
der Phospholipide

Fließmittel: Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (50:28:10:1, V/V/V/V), Entwicklungszeit: 2 Stunden und 15 Minuten.
1 = Startpunkt, 2 = Sphingomyelin, 3 = Lecithin, 4 = Lysocolaminkephalin, 5 = Inositphosphatid, 6 = Serinkephalin und Colaminkephalin, 7 = Cardiolipin. Sprühreagenz: 2'-7'-Dichlorfluorescein. Kamera: Flaubel Peco Junior 9x12/10x15 mit Symmar-Objektiv 1:5,6. Filmmaterial: Polaroid Landplanfilm, Typ 58. Belichtungszeit: 10 Minuten, Blende 19.

Der nach der endgültigen Auftrennung aller Lipidfraktionen ermittelte prozentuale Anteil der einzelnen Lipide an den Gesamtlipiden ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

TABELLE 2

Der prozentuale Anteil der einzelnen Lipide
an den Gesamtlipiden

	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
Neutralfette				
Cholesterinester..	2,6	3,1	5,7	4,7
Triglyceride.....	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
Freie Fettsäuren..	1,1	0,7	1,2	1,3
1.3-Diglyceride...	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
1.2-Diglyceride...	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
Freies Cholesterin	24,9	21,3	23,7	19,1
Monoglyceride.....	Spuren	Spuren	Spuren	Spuren
Phospholipide				
Cardiolipin.....	0,7	0,9	2,5	1,6
n.i ¹⁾	0,9	0,9	2,0	1,3
Colaminkephalin...	14,5	14,3	12,8	10,0
Serinkephalin.....	0,8	4,8	2,0	4,3
Inositphosphatid..	12,9	12,6	13,3	8,3
Lysocolaminke- phalin.....	0,4	0,7	0,8	1,9
Lecithin.....	21,8	21,2	15,0	24,2
Sphingomyelin.....	19,4	19,5	21,0	23,3

Den Hauptbestandteil der Neutralfette bildet das freie Cholesterin. Sein Anteil an den Gesamtlipiden beträgt durchschnittlich 22%, der Anteil der Cholesterinester 3,5%. Die übrigen Neutralfette kommen nur in sehr geringen

¹⁾ nicht identifizierte Fraktion

Mengen vor (bis zu 1,3%). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen MARCUS et al. (1969) bei der Untersuchung der Blutplättchen des Menschen.

Bei den Phospholipiden stellen Lecithin mit durchschnittlich 20,6% und Sphingomyelin mit durchschnittlich 20,8% die stärksten Fraktionen. Der Anteil von Colaminkephalin und Inositolphosphatid an den Gesamtlipiden beträgt durchschnittlich 12,9% bzw. 11,8%. Lysolecithin, das in menschlichen Thrombozyten in Spuren auftritt (COHEN und DERKSEN, 1969 und GIARDINI et al., 1972), konnte nicht nachgewiesen werden. Dagegen war Lysocolaminkephalin, das in den Thrombozyten des Menschen bisher nur von einem Autor beschrieben worden ist (NORDÖY und LUND, 1968), bei allen Versuchstieren vorhanden.

Wegen der äußerst komplexen Zusammensetzung natürlicher Lipidgemische ist die Reindarstellung einzelner Komponenten, insbesondere der Phospholipidfraktionen, sehr schwierig. Seit der Anwendung der Dünnschichtchromatographie in der Lipidanalytik wurde immer wieder nach einfachen, reproduzierbaren Verfahren zur eindimensionalen Auftrennung von Phospholipiden gesucht (WAGNER et al., 1961; MANGOLD, 1961; REDMAN und KEENAN, 1964; IACONO und ISHIKAWA, 1969; KAHOVKOVA und ODAVIC, 1969).

Es hat sich gezeigt, daß jedes Phospholipidgemisch seine besondere Auftrennungstechnik erfordert (MALINS, 1966). Aus diesem Grund konnten für die Auftrennung der Phospholipide der Pferdethrombozyten die Arbeitsbedingungen anderer Autoren nicht ohne Modifikationen übernommen werden. Wegen der unterschiedlichen Arbeitsbedingungen ist es nicht möglich festzustellen, ob die in den Pferdethrombozyten nachgewiesene nicht identifizierte Phospholipidfraktion den von anderen Autoren (BLONSTRAND et al., 1962; WOODSIDE et al., 1964 und KUNZ, 1972) beschriebenen nicht identifizierten Phospholipidfraktionen entspricht.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über alle Fettsäuren, die in den verschiedenen Lipiden von Pferdethrombozyten vorkommen und deren Anteil an den Gesamtfettsäuren mehr als 1% beträgt. Insgesamt wurden (von den in Spuren vorkommenden Fettsäuren abgesehen) 35 Fettsäuren nachgewiesen. In quantitativer Hinsicht von Bedeutung sind jedoch nur die folgenden 10 Fettsäuren: Myristin- (14:0), Palmitin- (16:0), Palmitolein- (16:1), Stearin- (18:0), Öl- (18:1), Linol- (18:2), Arachidon- (20:4), Behen- (22:0), Lignocerin- (24:0) und Nervonsäure (24:1).

Die Fettsäuren 18:3 und 20:1 konnten gaschromatographisch nicht getrennt werden und wurden zusammen erfaßt.

TABELLE 3: Zusammenstellung der Fettsäuren, die in den Lipiden der Pferdethrombozyten zu mehr als 1% enthalten sind.

Chemischer Name	Trivialname	Kurz- schreib- weise	C-Zahl	Rel. Ret. -Zeit
Tetradecansäure	Myristinsäure	14:0	14,0	0,32
	nicht identifiziert	a	14,7	0,39
Pentadecansäure	Pentadecylsäure	15:0	15,0	0,42
	nicht identifiziert	b	15,3	0,46
Hexadecansäure	Palmitinsäure	16:0	16,0	0,56
Hexadecensäure	Palmitoleinsäure	16:1	16,5	0,65
Heptadecansäure	Margarinsäure	17:0	17,0	0,76
	nicht identifiziert	c	17,3	0,82
Heptadecensäure	----	17:1	17,5	0,85
Octadecansäure	Stearinsäure	18:0	18,0	1,00
Octadecensäure	Ölsäure	18:1	18,5	1,15
	nicht identifiziert	d	18,8	1,26
Nonadecansäure	Nonadecylsäure	19:0	19,0	1,34
Octadecadiensäure	Linolsäure	18:2	19,3	1,5
	nicht identifiziert	e	19,7	1,6
Eicosansäure	Arachinsäure	20:0	20,0	1,8
Octadecatriensäure	Linolensäure	18:3	20,5	1,9
Eicosensäure	Gadoleinsäure	20:1		
	nicht identifiziert	f	20,8	2,2
Heneicosansäure	----	21:0	21,0	2,3
	nicht identifiziert	g	21,3	2,4
	nicht identifiziert	h	21,4	2,5
	nicht identifiziert	i	21,7	2,7
Docosansäure	Behensäure	22:0	22,0	3,0
	nicht identifiziert	k	22,2	3,3
Eicosatetraensäure	Arachidonsäure	20:4	22,4	3,4
Tricosansäure	----	23:0	23,0	4,2
	nicht identifiziert	l	23,5	4,5
	nicht identifiziert	m	23,8	5,1
Tetracosansäure	Lignocerinsäure	24:0	24,0	5,3
	nicht identifiziert	n	24,3	5,6
Tetracosensäure	Nervonsäure	24:1	24,5	6,2
	nicht identifiziert	o	24,7	6,8
	nicht identifiziert	p	25,3	8,0
Hexacosansäure	Cerotinsäure	26:0	26,0	9,9

In den Tabellen 4 - 16 sind die Fettsäurenmuster der einzelnen Lipidfraktionen dargestellt. Auf die gaschromatographische Untersuchung einiger in Spuren vorkommender Lipide (Monoglyceride und zum Teil Diglyceride und Phospholipide) ist verzichtet worden. In den 1.2- und 1.3-Diglyceriden (Tabelle 4 und 5) stellen Myristin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure den größten Anteil der Fettsäuren. Darüber hinaus ist Linolsäure, die bekanntlich bevorzugt am C-2-Atom des Glycerins verestert ist, am Aufbau der 1.2-Diglyceride zweier Pferde zu 7,2 bzw. 10,0 % beteiligt.

Ein Vergleich der Fettsäurenmuster dieser beiden Neutralfettfraktionen mit denen der menschlichen Thrombozyten ist nicht möglich, da MARCUS et al. (1969) lediglich darauf hinweisen, daß Diglyceride in den Blutplättchen des Menschen in Spuren vorkommen.

TABELLE 4
Fettsäurenmuster der 1.2-Diglyceride
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
14:0	19,6	16,7	19,6
a	----	1,1	----
15:0	----	4,0	----
b	----	1,5	----
16:0	28,0	27,8	30,2
16:1	9,5	9,4	6,2
17:0	----	1,8	3,6
c	3,2	2,7	----
17:1	2,4	2,4	----
18:0	11,6	13,4	13,8
18:1	15,7	14,3	8,2
18:2	7,2	2,0	10,0
e	1,6	2,9	3,7
l	1,2	----	----
24:0	----	----	2,3
24:1	----	----	2,4

TABELLE 5
 Fettsäurenmuster der 1.3-Diglyceride
 (Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
14:0	14,3	19,8	14,3	19,6
a	---	---	1,4	---
15:0	4,3	---	3,8	4,2
b	---	---	2,1	2,2
16:0	27,2	27,7	29,2	33,2
16:1	5,6	10,4	6,9	4,5
17:0	1,6	1,7	1,2	3,9
c	3,4	5,1	1,1	---
17:1	3,4	2,9	2,5	---
18:0	14,9	12,7	16,2	15,9
18:1	5,2	10,7	15,9	5,3
18:2	3,1	2,6	2,3	1,7
e	---	2,2	---	3,6
20:0	1,7	---	1,1	---
18:3	2,2	---	---	---
21:0	---	---	---	1,7
g	---	---	---	1,6
h	---	---	---	1,4
i	---	---	2,0	1,2
22:0	1,6	---	---	---
20:4	3,2	---	---	---
l	---	1,4	---	---
24:0	1,9	1,4	---	---
n	2,7	---	---	---
24:1	---	1,4	---	---
p	3,7	---	---	---

Die freien Fettsäuren (Tabelle 6) bestehen im Durchschnitt zu 74% aus Palmitin- und Stearinsäure. Der Gehalt an Ölsäure ist mit 2,4% - 12,7% im Vergleich zu den freien Fettsäuren der menschlichen Thrombozyten gering: MARCUS et al. (1969) fanden beim Menschen über 30%.

TABELLE 6
Muster der freien Fettsäuren
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
14:0	8,2	9,2	5,6	5,5
15:0	---	2,6	2,8	1,4
b	---	3,4	---	---
16:0	44,5	27,1	35,8	37,0
16:1	---	2,3	---	1,1
17:0	1,2	1,9	1,3	1,4
c	---	2,7	2,4	---
18:0	34,6	39,3	39,6	38,1
18:1	7,8	4,5	2,4	12,7
18:2	2,7	2,0	1,5	---
e	---	---	---	1,4
20:0	1,0	1,6	1,6	---
h	---	---	1,2	---
22:0	---	1,8	2,2	1,4
24:0	---	1,6	3,6	---

Die Fettsäurenmuster der Triglyceride sind in Tabelle 7 dargestellt. Palmitin-, Stearin- und Ölsäure dominieren. Bemerkenswert ist der im Vergleich zu den Triglyceriden des Pferdedepotfettgewebes und des Pferdeplasmas hohe Stearin- und relativ niedrige Ölsäureanteil in den Triglyceriden der Thrombozyten (WEIK und ALTMANN, 1971; WEIK und DREPPER, 1969).

Von den Triglyceriden der menschlichen Thrombozyten unterscheiden sie sich durch das Vorkommen von Linolen- und Arachidonsäure. Diese beiden mehrfach ungesättigten Fettsäuren kommen in den Triglyceriden der menschlichen Thrombozyten nicht vor.

TABELLE 7
Fettsäurenmuster der Triglyceride
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
14:0	4,2	7,6	3,2	9,6
15:0	---	---	---	2,4
16:0	30,5	29,6	20,0	30,2
16:1	2,9	4,7	2,8	3,0
17:0	---	---	---	1,0
c	---	---	---	3,1
17:1	3,7	6,5	2,3	---
18:0	18,4	25,9	18,5	16,9
18:1	21,9	17,1	20,1	14,7
18:2	7,2	5,9	13,7	7,7
e	---	---	---	1,7
18:3	4,4	1,4	6,4	2,4
g	---	---	2,6	1,7
h	2,7	1,3	---	1,3
i	---	---	2,6	---
22:0	1,1	---	1,4	---
20:4	3,0	---	6,4	4,3

Im Fettsäurenmuster der Cholesterinester (Tabelle 8) fällt der hohe Anteil an Linolsäure (bis zu 45%) auf. Das scheint charakteristisch für die Cholesterinester des Pferdes zu sein. WEIK und ALTMANN (1971) fanden in den Cholesterinestern des Plasmas bis zu 79% Linolsäure.

In den Cholesterinestern der menschlichen Thrombozyten, in denen die Linolsäure nur in Spuren nachgewiesen wurde, ist nach MARCUS et al. (1969) Palmitoleinsäure mit 34,5% am stärksten vertreten.

TABELLE 8
Fettsäurenmuster der Cholesterinester
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
14:0	7,1	4,7	6,0	1,5
a	---	1,8	---	1,8
15:0	---	1,3	1,5	2,2
b	---	---	---	1,5
16:0	24,2	13,9	15,6	20,3
16:1	6,7	8,0	5,2	7,9
c	1,8	1,8	1,8	4,0
17:1	1,8	1,5	1,5	1,5
18:0	7,5	4,8	6,4	8,5
18:1	16,0	8,1	11,4	7,5
18:2	26,3	45,2	42,9	33,4
e	---	---	---	1,2
20:0	---	---	---	1,2
18:3	2,7	---	3,9	---
f	---	---	---	2,1
21:0	1,9	1,9	1,8	---
i	---	---	2,0	---
20:4	1,9	---	---	---
k	---	2,7	---	---
m	---	2,1	---	2,2
24:0	2,1	---	---	1,4
24:1	---	---	---	1,8
o	---	2,2	---	---

TABELLE 9
 Fettsäurenmuster der Sphingomyeline
 (Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
14:0	15,3	5,2	4,4	1,7
15:0	---	1,4	---	---
16:0	26,1	20,4	16,4	18,0
16:1	---	1,3	---	---
17:0	1,6	---	---	---
18:0	15,4	11,5	12,4	9,5
18:1	3,3	---	1,7	---
20:0	5,0	5,1	5,1	4,7
22:0	13,2	19,1	20,8	23,4
23:0	---	3,0	---	---
24:0	9,9	17,4	15,3	27,7
24:1	10,2	13,3	23,9	15,0
26:0	---	2,3	---	---

Tabelle 9 zeigt das Fettsäurenmuster der Sphingomyeline. Der Gehalt an Myristinsäure, die in den Sphingolipidfraktionen der menschlichen Blutplättchen mit ungefähr 1% vertreten ist (GIARDINI et al., 1972), variiert bei den einzelnen Versuchstieren sehr stark: 1,7 - 15,3%. Die Sphingomyeline zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an langkettigen Fettsäuren, vor allem an Behen-, Lignocerin- und Nervonsäure aus. Das entspricht auch den an menschlichen Thrombozyten erhobenen Befunden und ist typisch für die Sphingolipide vieler Gewebe (VAN DEENEN, 1966).

TABELLE 10

Fettsäurenmuster der Lecithine
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd. 2	Pferd 3	Pferd 4
14:0	---	1,4	---	---
16:0	23,6	27,4	26,7	35,2
16:1	1,3	1,8	---	---
17:0	---	---	---	1,2
18:0	20,1	21,2	21,2	24,3
18:1	19,3	16,1	18,0	11,5
18:2	23,9	25,1	24,5	18,0
18:3	1,9	1,4	1,9	1,5
g	2,1	1,4	1,9	1,4
22:0	1,4	---	1,1	---
20:4	5,3	4,2	1,6	5,6
24:0	---	---	1,3	1,3
24:1	1,1	---	1,8	---

Die Fettsäurenmuster der Lecithine sind in Tabelle 10 dargestellt. Den Hauptanteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren bildet mit durchschnittlich 22,9% die Linolsäure, der Gehalt an Arachidonsäure beträgt durchschnittlich 4,2%. Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, als im Lecithin der menschlichen Blutplättchen der Arachidonsäuregehalt immer sehr viel größer ist als der Linolsäuregehalt (NORDÖY und LUND, 1968; COHEN und DERKSEN, 1969; MARCUS et al., 1969; GIARDINI et al., 1972).

TABELLE 11

Fettsäurenmuster der Lysocolaminkephaline
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 3
14:0	5,0	---
16:0	21,4	4,6
16:1	3,8	1,1
17:1	2,1	---
18:0	11,4	8,9
18:1	21,9	10,6
18:2	18,2	46,2
18:3	5,7	2,9
h	---	1,3
22:0	---	2,9
20:4	10,5	18,4
23:0	---	1,2
p	---	1,9

Tabelle 11 ist zu entnehmen, daß die Fettsäurenmuster der Lysocolaminkephaline, die nur bei zwei Pferden ermittelt wurden, erhebliche individuelle Unterschiede aufweisen. Diese Unterschiede betreffen vor allem Palmitin-, Öl-, Linol-, Linolen- und Arachidonsäure.

TABELLE 12

Fettsäurenmuster der Inositphosphatide
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3
14:0	---	13,2	---
15:0	---	4,6	---
16:0	3,8	25,6	6,8
16:1	---	8,7	---
17:0	---	1,3	---
c	---	2,4	---
17:1	---	1,3	---
18:0	61,7	25,4	73,2
18:1	20,1	9,4	11,4
18:2	7,9	5,6	6,9
e	---	1,3	---
20:0	---	1,2	---
18:3	2,1	---	---
g	---	---	1,7
22:0	2,7	---	---
o	1,7	---	---

Noch stärker unterscheiden sich die Fettsäurenmuster der Inositphosphatide (Tabelle 12) der einzelnen Versuchstiere voneinander. Die Extremwerte für die Palmitinsäure sind 3,8 bzw. 25,6% und für die Stearinsäure 25,4 bzw. 73,2%. Der Gehalt an Arachidonsäure, die wesentlich am Aufbau der Inositphosphatide menschlicher Blutplättchen beteiligt ist (MARCUS et al., 1969; COHEN und DERKSEN, 1969), liegt dagegen bei allen drei Pferden unter 1% und ist deshalb nicht angegeben.

TABELLE 13

Fettsäurenmuster der Serinkephaline
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3
14:0	---	2,4	---
16:0	---	6,5	2,9
16:1	---	1,9	---
18:0	54,4	54,7	48,5
18:1	20,7	15,5	15,2
18:2	23,7	17,3	27,0
18:3	---	---	2,2
g	---	1,7	---
22:0	---	---	1,0
20:4	1,2	---	---
24:0	---	---	3,2

Tabelle 13 zeigt das Fettsäurenmuster der Serinkephalinfraktion: Stearin-, Öl- und Linolsäure sind die Hauptkomponenten. Diese drei Fettsäuren sind am Aufbau der Serinkephaline zu 87,5 - 98,8% beteiligt. Arachidonsäure, die in den Serinkephalinen der menschlichen Thrombozyten mit ungefähr 20% vertreten ist (MARCUS et al., 1969; COHEN und DERKSEN, 1969), kommt in den Serinkephalinen der Pferdethrombozyten nur in Spuren vor. Im Vergleich zum Menschen liegen also ähnliche Verhältnisse wie in den Lecithinen vor.

TABELLE 14

Fettsäurenmuster der Colaminkephaline
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3	Pferd 4
15:0	---	---	1,1	---
b	2,6	1,9	---	1,8
16:0	3,9	4,1	4,0	4,3
16:1	---	1,1	---	---
c	1,9	---	---	---
18:0	23,8	31,1	34,6	28,2
18:1	20,9	18,3	19,3	14,6
d	---	---	---	1,9
18:2	29,5	25,8	26,4	26,2
18:3	1,6	---	---	---
f	---	---	1,4	4,2
g	---	1,3	---	1,2
i	1,2	2,2	2,2	1,5
22:0	1,5	---	---	---
20:4	13,1	14,2	11,0	16,1

Colaminkephaline, deren Fettsäurenmuster in Tabelle 14 dargestellt sind, sind die Phospholipidfraktionen mit dem größten Gehalt an Arachidonsäure (11,0 - 16,1%). Der Linolsäuregehalt bewegt sich in derselben Größenordnung wie beim Serinkephalin, beim Lecithin und bei der nicht identifizierten Phospholipidfraktion der Tabelle 15.

TABELLE 15

Fettsäuren der nicht identifizierten Phospholipidfraktionen
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3
14:0	3,1	9,7	3,8
15:0	---	2,9	---
16:0	10,2	23,1	17,6
16:1	2,9	7,9	---
17:0	---	1,6	---
17:1	---	2,8	---
18:0	32,0	17,5	28,9
18:1	19,1	8,9	17,8
18:2	25,7	20,4	23,7
20:0	1,0	---	---
18:3	2,6	---	---
f	---	2,3	---
20:4	3,4	2,9	---
23:0	---	---	8,2

TABELLE 16

Fettsäurenmuster der Cardiolipine
(Angaben in Gewichtsprozent)

Fettsäure	Pferd 1	Pferd 2	Pferd 3
14:0	---	5,8	---
16:0	3,7	18,5	3,0
16:1	1,3	3,1	1,1
17:0	---	1,7	---
17:1	---	2,3	---
18:0	16,8	26,3	10,6
18:1	13,7	10,7	9,8
18:2	44,9	28,1	63,4
18:3	5,5	3,5	2,9
21:0	1,7	---	---
8	1,6	---	2,1
22:0	---	---	1,1
20:4	9,5	---	6,0
24:0	1,3	---	---

Unter den Fettsäuren der Cardiolipine (Tabelle 16) dominiert zwar bei allen untersuchten Pferden die Linolsäure, aber ihr prozentualer Anteil an den Gesamtfettsäuren variiert bei den einzelnen Versuchstieren sehr stark (28,1 - 63,4%).

Gaschromatographische Untersuchungen der Cardiolipine menschlicher Thrombozyten liegen nicht vor. Bei MARCUS et al. (1969) findet sich der Hinweis, daß es nicht gelang, diese Fraktion dünn-schichtchromatographisch zu erfassen.

Zieht man abschließend Bilanz, so bedürfen 2 Befunde der besonderen Hervorhebung:

1. Die individuellen Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung einzelner Lipidfraktionen waren außerordentlich groß. Eine Variationsbreite ähnlicher Größenordnung konnte bei den Plasmalipiden des Pferdes nicht beobachtet werden.

Es ist nicht bekannt, ob solche individuellen Unterschiede auch bei den Thrombozytenlipiden des Menschen bestehen, da die Thrombozytenlipide zweier Individuen nie miteinander verglichen worden sind. Vielmehr mußten immer Blutproben eines größeren Kollektivs vereinigt werden. Die am Menschen erhobenen Befunde stellen daher Mittelwerte aus 20 - 40 Probanden dar.

2. In den Lipiden der Pferdethrombozyten dominiert unter den mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit deutlichem Abstand die Linolsäure. Arachidonsäure, die im Säugerorganismus durch Kettenverlängerung und Einführung weiterer Doppelbildungen aus Linolsäure synthetisiert werden kann, kommt dagegen nur in geringer Menge vor. Umgekehrt sind die Verhältnisse in den Lipiden der menschlichen Plättchen: Dort ist die vorherrschende mehrfach ungesättigte Fettsäure die Arachidonsäure. Dieser Unterschied ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß das Linolensäureangebot im Futter des Pferdes wesentlich größer ist als in der menschlichen Nahrung. Mit zunehmendem Linolensäuregehalt in der Nahrung wird der Arachidonsäuregehalt in den Lipiden der Gewebe kleiner. Das ist darauf zurückzuführen, daß die Umwandlung von Linolsäure in Arachidonsäure durch Linolensäure gehemmt wird (MOHRHAUER und HOLMAN, 1963).

D. ZUSAMMENFASSUNG

Die Neutralfette und Phospholipide von Pferdethrombozyten wurden dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und die Fettsäuremuster mit Hilfe der Gaschromatographie untersucht.

1. Hauptbestandteil der Neutralfette ist das freie Cholesterin. Die Cholesterinester bilden die zweitstärkste Fraktion.
2. Unter den Phospholipiden sind Sphingomyelin, Lecithin, Colaminkephalin und Inositphosphatid die größten Fraktionen.
3. Myristin-, Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Öl-, Linol-, Arachidon-, Behen-, Lignocerin- und Nervonsäure sind die Fettsäuren, die hauptsächlich am Aufbau der Thrombozytenlipide des Pferdes beteiligt sind.
4. Hauptkomponente in den Cholesterinestern ist die Linolsäure.
5. In den Sphingomyelinen überwiegen langkettige Fettsäuren (Behen-, Lignocerin- und Nervonsäure).
6. In allen übrigen Phospholipiden ist die wichtigste mehrfach ungesättigte Fettsäure die Linolsäure. Arachidonsäure kommt stets in geringeren Mengen vor (häufig nur in Spuren).
7. Die Fettsäurezusammensetzung einiger Lipidfraktionen variiert bei den einzelnen Versuchstieren außerordentlich stark.

SUMMARY

Neutral lipids and phospholipids of horse platelets were separated by thin layer chromatography and their fatty acid pattern studied by gaschromatography.

1. Free cholesterol was found to be the main component of neutral lipids whereas cholesteryl esters were the second largest fraction.
2. Sphingomyelin, lecithin, phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol are the main components of the phospholipids.
3. In the lipids of horse platelets there are ten main fatty acids: myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, arachidonic, behenic and nervonic acid.
4. The main fatty acid of cholesteryl esters is linoleic.
5. The sphingomyelins are characterized by a large number of long-chain fatty acids (behenic, lignoceric and nervonic).
6. In the other phospholipid fractions the main polyunsaturated fatty acid is linoleic. They contain only small amounts of arachidonic (traces only can be found in some fractions).
7. The fatty acid composition of some lipid fractions differ greatly from one horse to another.

E. LITERATURVERZEICHNIS

- BALL, D.L. und W.E. HARRIS, 1968: Selection of Optimum Position for Measuring Widths of Chromatographic Peaks with Minimum Error in Area. Anal. Chem. 40, 1113-1116.
- BARTLETT, G.R., 1959: Phosphorus Assay in Column Chromatography. J. Biol. Chem. 40, 466-468.
- BARTON, P.C., 1967: Sequence Theories of Blood Coagulation Re-evaluated with Reference to Lipid-Protein Interactions. Nature (London) 215, 1508-1509.
- BLOMSTRAND, R., F. NAKAYAMA und I.M. NILSSON, 1962: Identification of Phospholipids in Human Thrombocytes and Erythrocytes. J. Lab. Clin. Med. 59, 771-778.
- BREDDIN, K., 1968: Die Thrombozytenfunktion bei hämorrhagischen Diathesen, Thrombosen und Gefäßkrankheiten. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York.
- COHEN, P. und A. DERKSEN, 1969: Comparison of Phospholipid and Fatty Acid Composition of Human Erythrocytes and Platelets. Brit. J. Haem. 17, 359-371.
- DOCZY, A., 1965: Mit verschiedenen Konservierungsmitteln hergestellte Thrombozytensuspensionen. Bibl. Haemat. 20, 221-225.
- EGGSTEIN, M., 1966: Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe. 2. Mitteilung. Klin. Wschr. 44, 267-273.
- EGGSTEIN, M. und F.H. KREUTZ, 1966: Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe. 1. Mitteilung. Klin. Wschr. 44, 262-267.

- FISCHER, M. und E. DEUTSCH, 1969: Thrombozytenkoagulationsfaktoren. Aus: Der Thrombozyt. Herausgeber: Rudolf Marx. Lehmann Verlag, München.
- GIARDINI, O., D. DEL PRINCIPE, M. CASTRO, A. DONFRANCESCO, A. TORRONI und E. CARDI, 1972: Composizione Lipidica delle Piastrine nel Bambino e nell' Adulto normale. *Haematologica* (Pavia) 57, 97-106.
- GITEL, S.N., W.G. OWEN, C.T. ESMON und C.M. JACKSON, 1973: A Polypeptide Region of Bovine Prothrombin Specific for Binding to Phospholipids. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 70, 1344-1348.
- HAUROWITZ, F. und J. SLADEK, 1928: Über die chemische Zusammensetzung der Blutplättchen. *Hoppe - Seylers Zeitschrift f. Physiol. Chemie* 173, 233-234.
- HECHT, E. und K.H. SLOTTA, 1962: The Chemical Nature of the Lipid Aktivator in Blood Coagulation. *Amer. J. Clin. Path.* 37, 126-133.
- HECKERS, H. und W. STOFFEL, 1972: Sphingolipids in Blood Platelets of the Pig. *Hoppe - Seylers Zeitschrift f. Physiol. Chemie* 353, 407-418.
- HEMKER, H.C. und M.J.P. KAHN, 1967: Reaction Sequence of Blood Coagulation. *Nature* (London) 215, 1201-1202.
- IACONO, J.M. und T.T. ISHIKAWA, 1969: Simplified Preparative Thin-Layer Chromatography of Phospholipids. *J. Chromatogr.* 40, 175-176.
- KANOVCOVA, J. und R. ODAVIC, 1969: A Simple Method for the Quantitative Analysis of Phospholipids Separated by Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr.* 40, 90-96.

- KAISER, R., 1964: Chromatographie in der Gasphase. 4. Teil, Bibliographisches Institut, Mannheim.
- KATES, M., 1964: Simplified Procedures for Hydrolysis or Methanolysis of Lipids. J. Lip. Res. 5, 132-135.
- KO, H. und M.E. ROYER, 1967: A Submicromolar Assay for Nonpolar Acids in Plasma and Depot Fat. Analyt. Biochem. 20, 205-214.
- KUNZ, F., 1972: The Participation of Phospholipids in the Intrinsic Pathway of the Coagulation Process. Klin. Wschr. 50, 528-530.
- LEFFLER, H.H., 1959: Estimation of Cholesterol in Serum. Amer. J. Clin. Path. 31, 310-313.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL, 1951: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- LÜSCHER, E.F., 1969: Die Physiologie der Thrombozytenfunktion. Folia Haemat. 92, 433-447.
- MALINS, D.C., 1966: Recent Developments in the Thin-Layer Chromatography of Lipids. Aus: Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids. Herausgeber: R.T. Holman, Pergamon Press, Oxford, 8, 301-358.
- MANGOLD, H.K., 1961: Thin-Layer Chromatography of Lipids. J. Am. Oil Chem. Soc. 38, 708-727.
- MARCUS, A.J. und T.H. SPAET, 1958: Platelet Phosphatides: Their Separation, Identification and Clotting Activity. J. Clin. Inv. 37, Band II, 1836-1847.
- MARCUS, A.J., H.L. ULLMANN und L.B. SAFIER, 1969: Lipid Composition of Subcellular Particles of Human Blood Platelets. J. Lip. Res. 10, 108-114.

- MARCUS, A.J., H.L. ULLMAN und M. WOLFMAN, 1960: Studies on Blood Platelet Phospholipids. J. Lip. Res. 1, 179-187.
- MINOR, A.H. und L. BURNETT, 1952: Separation, Concentration and Transfusion of Platelets from Normal Human Blood. Fed. Proc. 11, 422-423.
- MOHRHAUER, H. und R.T. NOLMAN, 1963: Effect of Linolenic Acid Upon the Metabolism of Linoleic Acid. J. Nutrition 81, 67-74.
- MOURAD, N., 1968: A Simple Method for Obtaining Platelets Concentrates Free of Aggregates. Transfusion 8, 48.
- O'BRIEN, J.R., 1958: Phospholipids, Proteins and Platelet-Lipoid. Nature (London) 181, 420.
- NORDÖY, A. und S. LUND, 1968: Platelet Factor 3 Activity, Platelet Phospholipids and their Fatty Acid and Aldehyde Pattern in Normal Male Subjects. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 22, 328-338.
- PARKER, F. und N.F. PETERSON, 1965: Quantitative Analysis of Phospholipids and Phospholipid Fatty Acids from Silica Gel Thin-Layer Chromatograms. J. Lip. Res. 6, 455-460.
- REDMAN, C.M. und R.W. KEENAN, 1964: A Method for the Unidimensional Separation of Phospholipids by Thin-Layer Chromatography. J. Chromatogr. 15, 180-185.
- SCOTT, R.F., K. ALOUSI, F. GOODALE, A.M. GITTELSON und W.A. THOMAS, 1961: Dietary Lipids, Thrombosis and Clot Lysis. Arch. Path. 71, 714-719.

- SKIPSKI, V.P., M. BARCLAY, E.S. REICHMANN und J.J. GOOD, 1967: Separation of Acidic Phospholipids by One-Dimensional Thin-Layer Chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 137, 80-89.
- STEIN, P. und M. KARL, 1969: Probleme der Präparation und der Konservierung von Thrombozytenkonzentraten. *Folia Haemat.* 92, 577-581.
- VAN DEENEN, L.L.M., 1966: Phospholipids and Biomembranes, Aus: *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. Herausgeber: R.T. Holman, Pergamon Press, Oxford, 3, 1-127.
- WAGNER, H., L. NÖRHAMMER und P. WOLFF, 1961: Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. *Biochem. Ztschr.* 334, 175-184.
- WATSON, D., 1960: A Simple Method for the Determination of Serum Cholesterol. *Clin. Chim. Acta* 5, 637-643.
- WAYS, P. und D.J. HANAHAN, 1964: Characterization and Quantification of Red Cell Lipids in Normal Man. *J. Lip. Res.* 5, 318-328.
- WEIK, H. und H.J. ALTMANN, 1971: Das Verhalten einiger Blutlipide während des Hungerns beim Pferd. *Zbl. Vet. Med. A.* 18, 131-138.
- WEIK, H. und K. DREPPER, 1969: Die gaschromatographische Untersuchung des Pferdedepotfetts unter Berücksichtigung der in Spuren vorkommenden Fettsäuren. *Zbl. Vet. Med. A.* 16, 8-12.

WESTPHAL, U., F.A. ODELL und H.W. GLASCOCK, 1960:

Lipids of Human and Bovine Platelets. USAMRL-Report
No. 425. Projekt-No. 6X 64 - 14 - 001 - 02.

WOODFORD, F.P. und C.M. VAN GENT, 1959: Gas-Liquid

Chromatography of Fatty Acid Methyl-Esters: The
"Carbon-Number" as a Parameter for Comparison of
Columns. J. Lip. Res. 1, 188-190.

WOODSIDE, E.E., D.G. THERRIAULT und W. KOCHOLATY, 1964:

Lipids of Human Platelets and their Action on the
Blood Coagulation Process. Blood 24, 76-91.

ZÖLLNER, N. und D. EBERHAGEN, 1965: Untersuchung und Be-

stimmung der Lipide im Blut. Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, New York.

ZAK, B., C. DICKENMANN, E.G. WHITE, H. BURNETT und P.J.

CHERNEY, 1954: Rapid Estimation of Free and Total
Cholesterol. Amer. J. Clin. Path. 24, 1307-1315.

Zum Abschluß der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Hubert Weik für die Überlassung des Themas, der benötigten Einrichtungen und Materialien sowie für die Hilfe bei der Abfassung der Arbeit.

Frau Cox und Frl. Bührma danke ich für die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Für die Anfertigung der Fotografien danke ich Herrn Fricke.

LEBENS LAUF

Am 25.3.1946 wurde ich als Sohn der Kindergärtnerin Elisabeth Muhs und des Tierarztes Dr. Wilhelm Risse in Illerrieden, Kreis Ulm, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Westerrönnfeld, Kreis Rendsburg, von 1952-1956 und der Mittelschule in Rendsburg von 1956-1962 besuchte ich von 1962-1966 das Helene-Lange-Gymnasium in Rendsburg, an dem ich im Februar 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1966 bis 1967 war ich an der Technischen Universität Berlin, Fakultät für Maschinenbau, immatrikuliert. Im WS 1967/68 begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Veterinärmedizin, das ich im September 1972 mit der tierärztlichen Prüfung abschloß.

Seither arbeite ich zur Anfertigung meiner Dissertation im Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin.

